



Art Unit
Examiner
Serial No.
Filed
Inventors

: 1646
: N. Basi
: 09/129,758
: August 5, 1998
: Rainer Waldmann
: Frederic Bassilana
: Eric Lingueglia
: Michel Lazdunski
: Catherine Heurteaux
: Guy Champigny
Title : MAMMAL NEURONAL ACID
: SENSING CATIONIC CHANNEL,
: CLONING AND APPLICATIONS
: THEREOF



22469

PATENT TRADEMARK OFFICE

Docket No.: 1099-00

Confirmation No.: 5113

Date: December 2, 2002

RECEIVED

DEC 06 2002

TECH CENTER 1600/2900

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

We submit herewith the certified copies of French Application Nos. 97/01574, filed February 11, 1997 and 97/09587 filed July 28, 1997, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

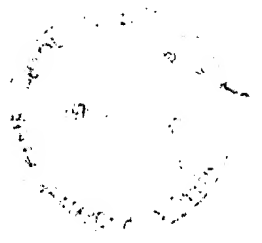
T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC:cc
(215) 563-1810

RECEIVED

DEC 11 1961

TECH CENTER 10001560



THIS PAGE BLANK (USPTO)



RECEIVED

DEC 06 2002

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE CERTIFIÉE CONFORME

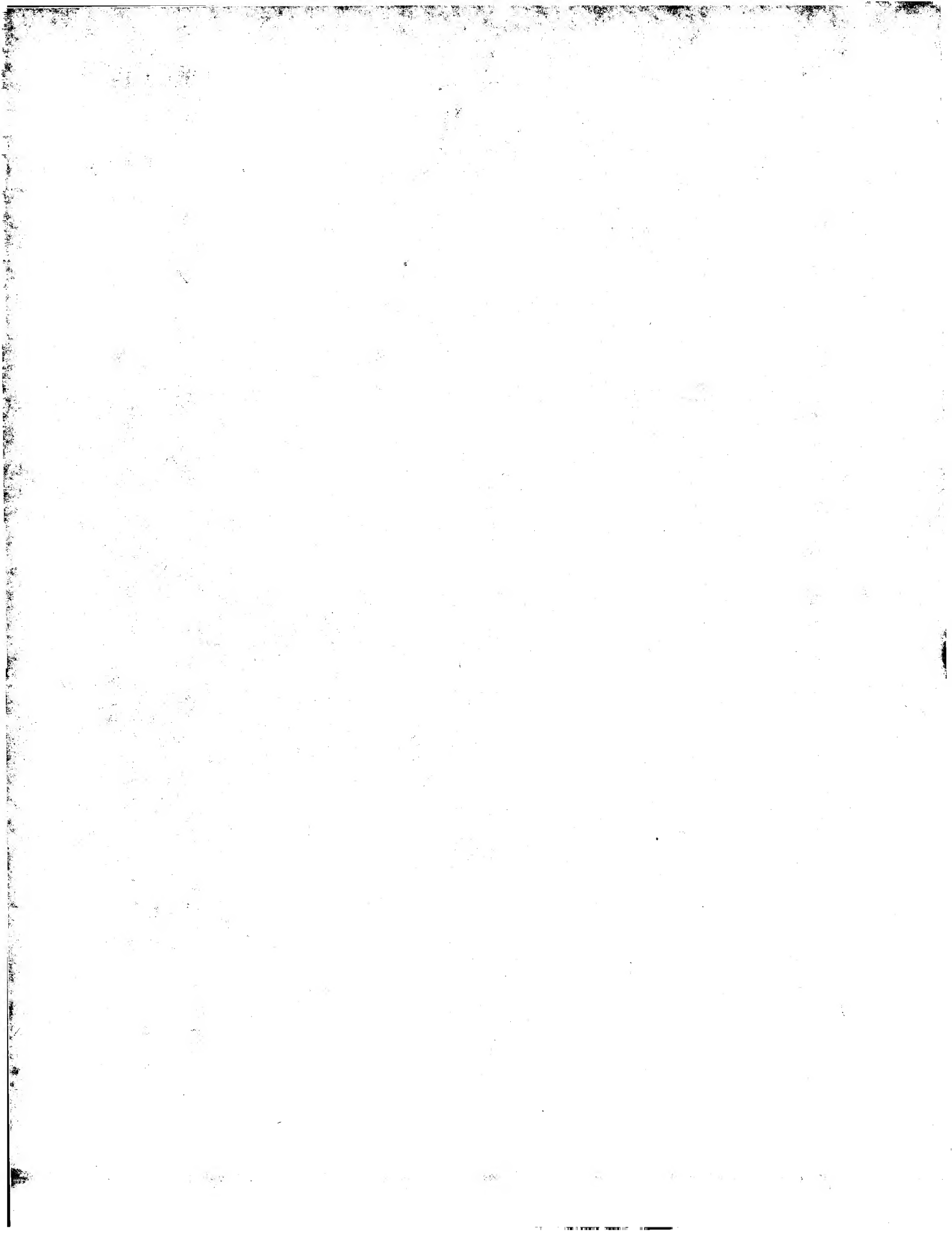
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 04 mai 2001

Fait à Paris le

19 NOV 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES

Réservé à l'INPI

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

11.FEV.1997
97 01574 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

11.02.97

1

**NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

F17B19FR

références du correspondant

téléphone

01.47.03.67.77

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE MAMMIFERE SENSIBLE A L'ACIDITE, SON
CLONAGE ET SES APPLICATIONS.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS-

Forme juridique

Nationalité (s)

FRANCAISE

Adresse (s) complète (s).

3, rue Michel Ange
75015 PARIS

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Marc MAJEROWICZ
960703

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30 F17B19FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97/01574

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE MAMMIFERE SENSIBLE A L'ACIDITE
A L'ACIDITE, SON CLONAGE ET SES APPLICATIONS.

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

-WALDMANN Rainer
Chemin de Chense
83600 LES ADRETS DE L'ESTEREL

-BASSILANA Frédéric
Villa les Tilleuls
992, Route de Grasse
06620 GOURDON

-LAZDUNSKI Michel
21, avenue Colombo
06000 NICE

-CHAMPIGNY Guy
3, place Carrée
06560 VALBONNE

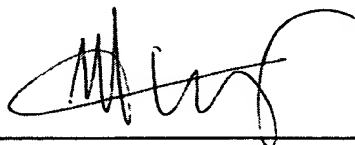
-HEURTEAU Catherine
Résidence Elvira Hills D1
1187, Route de St Jean
06600 ANTIBES

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 22 Avril 1997

Marc MAJEROWICZ
960703



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
4				08.12.97	11 DEC. 1997 - SR
31-34				14/12/98	08 JUL. 2001 - VD
p. 32				16/6/01	19 JUL. 2001 - VD

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE
MAMMIFÈRE SENSIBLE A L'ACIDITÉ, SON CLONAGE ET SES
APPLICATIONS.

5 La présente invention concerne une nouvelle
famille de canaux ioniques de mammifère, notamment humain,
sensible à l'acidité. Elle concerne plus particulièrement
l'identification et la caractérisation moléculaire, chez
l'homme et le rat, d'un nouveau canal cationique activé
10 par les protons, dénommé ci-après "ASIC" pour désigner les
termes anglais "Acid Sensing Ionic Channel". Le canal ASIC
constitue le premier membre d'un groupe de canaux
cationiques, appartenant à la famille des canaux sodium de
dégénérine sensible à l'amiloride (6, 11-14), qui est
15 activé transitoirement par une acidification
extracellulaire.

 La sensibilité à l'acide est associée à la
fois à la nociception (1) et à la transduction du goût
(2). La stimulation de neurones sensoriels par les acides
20 revêt une grande importance, car l'acidité accompagne de
nombreuses situations inflammatoires et ischémiques
douloureuses. La douleur causée par les acides est
interprétée comme étant médiée par des canaux cationiques
présents au niveau des neurones sensoriels, et qui sont
25 activés par les protons (3-5). Les propriétés biophysiques
et pharmacologiques des canaux ASIC de l'invention sont
proches de celles des canaux cationiques activés par les
protons décrits dans les neurones sensoriels (3, 15, 16).
Toutefois, comme cela apparaîtra dans la description ci-
30 après, il n'a été à ce jour jamais décrit de canaux
ioniques activés par un ligand plus simple que les canaux
ASIC.

 La présente invention a donc pour objet une
35 protéine constituant un canal cationique neuronal sensible

à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

De tels dérivés sont ceux dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas les propriétés fonctionnelles et structurelles du canal ASIC, principalement son activation par les protons. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques décrites dans les exemples donnés ci-après qui ont permis de mettre en évidence les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal ASIC.

Un exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine ASIC humaine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, et qui est sensiblement identique à celle du canal ASIC de rat représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1.

Un autre exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine constituant un canal cationique de dégénérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCl" (20) dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3. MDEG a été décrit comme un canal cationique de mammifère sensible à l'amiloride qui est activé par des mutations responsables de neurodégénérescence avec les dégénérines de *C. elegans*. Le canal MDEG est un parent structural du canal ASIC, dont la séquence en acides aminés présente environ 67% d'homologie

avec la séquence du canal ionique MDEG. Toutefois, les propriétés électrophysiologiques de ces deux canaux sont différentes car ils ne sont pas activés par les mêmes changements de pH. Ainsi, la gamme de sensibilité de MDEG (EC₅₀ = 4,05) est différente de celle de ASIC (EC₅₀ = 6,2).

Il a été montré que le canal MDEG est activé par les mêmes mutations que celles causant une dégénérescence neuronale chez *C. elegans*. Ainsi, comme les mutants de dégénérine de *C. elegans* hyperactifs, les mutants actifs de MDEG sont responsables d'une mort cellulaire, indiquant que l'acquisition de fonction par ce canal ionique neuronal serait impliquée dans plusieurs formes de dégénérescence neuronale de mammifère et notamment humaine. Mais aucune fonction physiologique normale de MDEG n'était connue jusqu'à la mise en évidence de son activation par les protons conformément aux canaux cationiques de la présente invention.

L'invention concerne aussi un canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons. Avantagusement, ladite seconde protéine est aussi une protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention. A titre d'exemple d'une telle association, on peut citer l'association de la protéine du canal ASIC avec la protéine du canal MDEG, permettant de former un canal hybride présentant une troisième gamme de sensibilité au pH (EC₅₀ = 4,8).

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique de l'invention et/ou contre un canal hybride ci-dessus, peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites

dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal ASIC et/ou ses dérivés.

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC est celle représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Une autre molécule d'ADN selon l'invention est celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2 ou sous le numéro SEQ ID NO : 3, ou leur séquence complémentaire.

L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal ionique selon l'invention. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie

moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine constituant un canal cationique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal cationique,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques de l'invention.

A titre d'exemple, un procédé d'expression d'un canal ionique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans une cellule,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression de canaux ioniques de l'invention.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agit de tout vecteur comme un plasmide.

L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les canaux ASIC et/ou ses dérivés comme MDEG obtenues conformément aux procédés précédents.

Ces cellules sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité,

tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût. Ce criblage est effectué en mettant en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant les canaux ASIC, puis en mesurant, par
5 tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux. Des techniques électrophysiologiques permettent également ces études et font aussi l'objet de la présente invention dès lors qu'elles mettent en oeuvre les canaux ASIC ou leurs
10 dérivés.

Ces criblages permettent d'identifier de nouveaux médicaments utiles dans le traitement ou la prévention de la douleur. Ils permettent également de rechercher des agents modulateurs du goût acide. En outre,
15 ils permettent de rechercher des bloqueurs qui sont susceptibles d'inhiber des neurodégénérescences provoquées par hyperexpression de ces canaux. Les canaux ASIC ont en effet des propriétés de sélectivité ionique, notamment en ce qui concerne leur perméabilité sélective au sodium,
20 potassium et calcium, qui les destinent à avoir des propriétés excitotoxiques lorsqu'ils sont hyperstimulés.

Une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies
25 impliquant la perception douloureuse de l'acidité qui intervient dans les maladies inflammatoires, les ischémies et dans un certain nombre de tumeurs. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un
30 canal ionique selon l'invention.

Une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine constituant un canal ASIC ou un dérivé de celui-ci, ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide
35 nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux ASIC,

sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux sur-exprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connues de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux ASIC.

Les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite molécule sont donc susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une déficience des canaux ASIC au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par lesdites molécules pour le traitement de pathologie impliquant les canaux ASIC et leurs dérivés.

Outre la propriété d'être activé par les protons et les applications décrites ci-dessus qui en résultent dans le domaine de la perception de l'acidité, le canal ASIC, du fait de sa parenté structurale avec le canal MDEG, est susceptible de se comporter comme une dégénérine neuronale à la suite de mutation.

La mort de certains neurones est caractéristique de plusieurs types de dégénérescences neuronales telles que les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'ataxie cérébelleuse. Seuls quelques gènes déficients sont connus et plusieurs restent encore à identifier. Le réseau neuronal primitif du nématode *C. elegans* constitue un bon modèle du développement et de la mort neuronal. La dégénérescence héréditaire chez *C. elegans* peut être due à des mutations des dégénérines deg-

1, mec-4 et mec 10. Les homologues avec les sous-unités du canal sodium sensible à l'amiloride, le produit d'expression fonctionnel des chimères mec-4 du canal sodium épithélial, suggèrent que les dégénérines sont des canaux ioniques dont l'acquisition de fonction est la cause de dégénérescence neuronale.

La présente invention concerne donc aussi les applications du canal ASIC pour l'étude de ses modifications pathologiques susceptibles de conduire à des dégénérescences. Les techniques mises en oeuvre pour ces applications, par exemple pour le criblage de drogues, sont similaires à celles décrites précédemment pour la recherche d'agents modulateurs du goût ou d'analgésiques.

En outre, une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant une dégénérescence neuronale cérébrale. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence et à la caractérisation du canal ASIC, et dans laquelle il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

- SEQ ID NO : 1 représente la séquence de 526 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence de l'ADNc de rat.

- SEQ ID NO : 2 représente la séquence partielle de 514 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence partielle de l'ADNc humain.

- SEQ ID NO : 3 représente la séquence de 512 acides aminés de la protéine du canal MDEG déduite de la séquence de l'ADNc humain.

5 - La figure 1 représente l'alignement des séquences des protéines ASIC de rat (en haut) et humain (en bas) des séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2. La comparaison de ces séquences fait apparaître l'absence de 14 acides aminés au début de la phase codante humains par rapport à celle du rat.

10 La figure 2 représente la comparaison de la séquence de la protéine du canal ASIC avec la séquence d'autres canaux ioniques :

15 - MDEG (14), un canal cationique de mammifère qui est activé par des mutations responsables de neurodégérescences avec les dégénérines de *C. elegans*.

 - FaNaCh (10), un peptide d'un canal sodium de *Helix aspersa* qui est activé par la FMRFamide.

 - La dégénérine MEC-4 (12) de *C. elegans*.

20 Dans cette figure, les résidus identiques ou similaires à ceux de ASIC sont imprimés respectivement en blanc sur fond noir et en noir sur fond gris. Les régions supposées transmembranaires (MI, MII) d'ASIC sont marquées par des barres noires.

25 La figure 3 représente l'arbre phylogénétique des protéines des sous unités α NaCh, β NaCh, γ NaCh, δ NaCh du canal sodium sensible à l'amiloride et des dégénérines MEC-4, MEC-10 et DEG-1 de *C. elegans*.

30 La figure 4 représente la topologie qui est proposée pour cette dernière famille de canaux ioniques (30).

 La figure 5 montre les propriétés biophysiques du canal ASIC1 activé par les protons.

35 - En a : les courants macroscopiques entrant enregistrés à -70 mV après des rapides changements du pH de pH 7,4 à pH 6.

- En b : La courbe dose réponse du pH extracellulaire. Le pH initial était de 7,4 et les points représentent les valeurs moyennes de 6 expériences. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques à -70 mV.

- En c : les relations Q-V des patch "outside-out" avec 140 mM de Na⁺ (■) ou de Li⁺ (•) dans la solution du bain. Q est la charge transportée durant la transition de pH acide. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques dans un milieu contenant du Na⁺.

- En d : les courants activés par les protons H⁺ enregistrés à différents potentiels dans un patch "outside-out" dans un milieu contenant du Na⁺.

- En e : les relations moyennes i-V mesurées à partir de patch "outside-out" avec 140 mM de Na⁺ (■), 140 mM de Li⁺ (•) ou 1,8 mM de Ca²⁺ (▲), en tant qu'ions perméables majoritaires dans les solutions externes ; les potentiels d'inversion étaient respectivement de 65 mV, 58 mV et -34 mV.

- En f : le courant de protons à travers le canal ASIC1. Les relations entre le pic de courant et le voltage ont été mesurées à partir de patch "outside-out" dans une solution de Na⁺ libre, Ca²⁺ libre avec des pipettes contenant une solution de K⁺ libre, à pH 4 (•) et à pH 3 (■). (▲) représentent les résultats obtenus dans les mêmes conditions que (■) mais avec du KCl dans la pipette. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques enregistrées dans les conditions (▲).

La figure 6 montre l'effet du Ca²⁺ et de l'amiloride sur le courant ASIC.

- En a : les courants activés par les protons H⁺ enregistrés à différents potentiels membranaires à partir d'un patch outside-out avec 1,8 mM de Ca²⁺ dans une solution de Na⁺ libre ; les courants se sont inversés à -35 mV.

- En b : Les relations Q-V moyennes à partir d'un patch outside-out enregistrées dans des solutions de Na^+ libre contenant 1,8 mM de Ca^{2+} (o, potentiel d'inversion -34 mV) ou 0,1 mM de Ca^{2+} (*, potentiel d'inversion -80 mV).

- En c : L'effet du Ca^{2+} externe sur le pic macroscopique de courant entrant enregistré à -70 mV et activé par un changement rapide de pH de pH 7,4 à pH 6. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques. Les points représentent les valeurs moyennes \pm se de 5 oocytes.

- En d : L'effet de l'amiloride sur les courants activés par les protons H^+ enregistré à 0 mV à partir d'un patch outside-out.

- En e : L'inhibition du courant macroscopique (induit par un changement de pH de pH 7,4 à pH 6) à -70 mV par l'amiloride et dérivés. Les points représentent les valeurs moyennes \pm se de 5 oocytes.

La figure 7 montre la distribution tissulaire de l'ARNm du canal ASIC.

- En a : L'analyse en Northern blot de l'expression ARNm du canal ASIC dans des tissus humains.

- En b : L'analyse en RT-PCR de l'expression de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau de rat et dans le ganglion de la racine dorsale (DRG). (+), (-) représentent respectivement les échantillons avec ou sans reverse transcriptase. Des sections d'un gel d'agarose révélé au bromure d'éthidium 1%. Les flèches indiquent la taille escomptée (657 pb) du produit de PCR.

La figure 8 représente l'hybridation *in situ*.

- En a et b : L'hybridation de sections de 6 μm d'un ganglion de la racine dorsale d'un rat âgé de 3 mois avec la sonde E marquée à la digoxigénine. En a : Une microphotographie à faible pouvoir éclairant

(grossissement de 30 fois). En b : Une image à haute résolution (grossissement de 80 fois) de a. On note le marquage intense des neurones de petit diamètre (flèches). Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec les sondes A, C et D.

- En c : La distribution de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau d'un rat adulte analysée par hybridation in situ avec l'oligonucléotide antisens C. Des résultats identiques ont été obtenus avec l'oligonucléotide B. Les couleurs indiquent l'abondance (rouge : haute expression ; bleu : non détectable). Les abréviations utilisées dans la figure sont les suivantes : Cer = Cerebellum ; Hip = Hypocampe ; OB = Bulbe olfactif ; Cx = Cortex.

I - Matériels et Méthodes.

1) Clonage du canal ASIC.

Les séquences conservées de la famille de canaux ioniques ASIC ont été utilisées pour préparer les amorces PCR de séquences suivantes :

TTYCCIGCIRTACIITNTGYAAY, et
CAIARICCIAIITGNCCNCCDAWRTC.

Une banque d'ADNc de cerveau de rat (Stratagène #936515) a été hybridée avec le produit de PCR de 1 kB de cerveau de rat et des clones partiels ont été isolés. L'extrémité 5' de l'ADNc (202 bp) a été isolée par PCR après une ligation adaptée à l'ADNc double brin.

2) Electrophysiologie.

0,25 ng d'ARNc a été injecté dans des oocytes de *Xenopus laevis* et les microélectrodes d'enregistrement pour le voltage imposé et pour le patch-clamp ont été mises en place deux jours après l'injection. Les solutions de bains pour les enregistrements de patch

outside-out et les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM KCl (ou NMDG), 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 7,4 (avec KOH). Les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM NaCl (ou LiCl ou NMDGCl), 2 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, pH 7,4 (ajusté avec HCl, NaOH, LiOH ou TMAOH). Les changements rapides de pH depuis le pH initial ont été obtenus par perfusion avec une solution de bain ajustée aux pH indiqués dans les figures. L'acidification intracellulaire des oocytes a été réalisée en injectant 50 nl de la solution interne à pH2 ou par perfusion et retrait d'un milieu de bain contenant 20 mM NH₄Cl. Aucun des courants enregistrés n'était contaminé par le courant Ca²⁺ sensible au Cl⁻ de l'oocyte de *Xenopus*. Les données ont été échantillonnées à 2 kHz et filtrées à 500 Hz pour l'analyse (Logiciel Biopatch).

3) Analyse Northern Blot, RT-PCR et hybridation in situ.

Le Northern blot a été obtenu auprès de la Société Clontech (Palo Alto, Ca) et contenait environ 2 µg d'ARN poly(A+) par ligne. Le blot a été hybridé avec un fragment du clone partiel humain (correspondant aux bases 270 à 764 du clone de rat) marqué au ³²P, à 65°C dans 6xSSC. Pour l'analyse RT-PCR, 5 µg de l'ARN total de cerveau de rat et 3 µg de ganglion de la racine dorsale ont été reverse transcrits et 1/30 de l'échantillon a été amplifié par 30 cycles de PCR avec les amorces de séquences ci-dessous :

ATTGCTCTTCCCATCTCTAT, et
TTCAAGGCCCATACCTAAGT.

Les contrôles négatifs ont été traités de façon identique, à l'exception de la reverse transcriptase

qui n'a pas été ajoutée. Les oligonucléotides antisens correspondant aux bases 70 à 114 (A), 215 à 248 (B), 1821 à 1859 (C), 1896 à 1940 (D) et l'ADN double brin correspondant aux bases 1685 à 2672 ont été utilisés pour les hybridations *in situ*. Les sections de cerveau de rat adulte ont été hybridées avec les oligonucléotides B ou C dont l'extrémité était marquée au ^{32}P , pour une nuit à 37°C dans 50% formamide, 2xSSC, puis lavées à température ambiante dans 1xSSC. Le signal a été aboli par un excès 500 fois d'oligonucléotides non marqués. Les sections de ganglion de la racine dorsale ont été hybridées avec les oligonucléotides A, C ou D marqués par la digoxigénine (DIG)-dUTP et avec la sonde E marquée par DIG-d-UTP par PCR. Le marquage des sondes, la préparation des échantillons, l'hybridation et la visualisation des acides nucléiques DIG avec la phosphatase alcaline conjuguée à des anticorps anti-DIG ont été réalisés conformément aux protocoles du fournisseur (Boehringer Mannheim).

4) Analyse informatique.

L'alignement de séquences et l'arbre phylogénétique (substitution Kimura, option UPGMA) ont été réalisés avec le logiciel GCG (Genetics Computer Group, Madison WI).

II - Résultats.

L'ADNc de 35 kb isolé de cerveau de rat code pour une protéine de 526 acides aminés qui présente, comme montré sur la figure 2, des homologies avec tous les membres clonés de la famille des canaux sodium de dégénéérine sensibles à l'amiloride.

Comme montré sur la figure 5, l'expression de l'ARNc dans des oocytes de *Xenopus* a induit un courant entrant activé par les protons H^+ . Les propriétés

biophysiques et la pharmacologie du canal ASIC sont proches de celles décrites pour les canaux cationiques activés par les protons des neurones sensoriels (3, 15, 16). Une baisse du pH extracellulaire au dessous d'un pH de 6,9 active un courant entrant rapidement élevé et désensibilisé (figure 5 a et b). Ce canal est activé par les protons extracellulaires, puisque, comme montré sur la figure 5 (c et d), l'application d'un acide sur la face extracellulaire de patch outside-out active le canal. L'acidification intracellulaire d'oocytes et l'acidification de la face intracellulaire de patch outside-out n'active pas le canal ASIC ni n'altère le courant ASIC induit par les protons extracellulaires.

L'analyse des courbes I-V de la figure 5 (c et e) enregistrées avec différents cations extracellulaires montre que Na^+ est l'ion perméable majoritaire (canal de conductance simple 14,3 pS). Comme le canal ionique sensible aux protons des neurones sensoriels (15, 16), le canal ASIC discrimine faiblement entre les cations (figure 5 c, e, f). En effet, le canal est aussi perméable à Li^+ , K^+ , Ca^{2+} et H^+ , avec des rapports $\text{pNa}^+/\text{pLi}^+ = 1,3$ (figure 5 c, e), $\text{pNa}^+/\text{pK}^+ = 13$ (figure 5 c, e), $\text{pNa}^+/\text{Ca}^{2+} = 2,5$ (figure 5 e) et $\text{pNa}^+/\text{H}^+ = 0,8$ (figure 5 f). La perméabilité au Ca^{2+} de ASIC pourrait être un chemin d'entrée voltage indépendant de Ca^{2+} dans la cellule. Un courant entrant de Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux ASIC peut être détecté en l'absence de Na^+ extracellulaire (figure 6 a, b). Comme indiqué sur la figure 5 (e) la conductance unitaire pour Ca^{2+} était de 5,2 pS. En présence de 140 mM de Na^+ extracellulaire, l'augmentation des concentrations en Ca^{2+} externe, a diminué l'amplitude du courant activé par les protons (figure 6c), démontrant ainsi que Ca^{2+} inhibe la perméabilité au Na^+ . Un blocage par le Ca^{2+} externe est caractéristique du $\text{I}(\text{H}^+)$ des neurones sensoriels (17). Le

courant entrant activé par H^+ dans les neurones sensoriels est inhibé par l'amiloride (18) et l'éthylisopropylamiloride (EIPA) (19). Comme montré à la figure 6 (d, e) le canal ASIC présente la même pharmacologie et est bloqué de façon réversible ($K_d = 10 \mu M$) par l'amiloride et ses dérivés benzamil et EIPA.

Par ailleurs, la protéine du canal ASIC présente environ 67% d'homologie de séquences avec le canal ionique de dégénéérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCl" (20). Toutefois, les propriétés électrophysiologiques de ces deux clones exprimés dans les oocytes de *Xenopus* sont clairement différentes :

- Comme montré sur la figure 5a, le canal MDEG n'est pas activé par les mêmes changements de pH que le canal ASIC.

- La substitution du résidu glycine en position 430 de MDEG par un acide aminé encombrant acide, comme la valine ou la phénylalanine active le canal (14), tout comme la mutation de l'alanine en position 704 de la dégénéérine MEC-4 cause une neurodégénérescence chez *C. elegans* (12). Des mutations identiques d'ASIC (glycine en position 431 remplacée par la valine ou la phénylalanine) n'entraînent pas d'activité et les mutants ne peuvent pas être activés par les protons.

Les canaux cationiques activés par les protons ont été décrits dans les neurones sensoriels mais aussi dans les neurones du système nerveux central (21). La distribution tissulaire de l'expression de l'ARNm du canal ASIC est en accord avec cette observation. Comme rapporté dans la figure 7a, un transcrit de 4,3 kb a été détecté dans le cerveau par analyse en Northern blot, et les résultats de la RT-PCR rapportés à la figure 7b montrent que le ganglion de la racine dorsale exprime l'ARNm de ASIC. La figure 8 (a,b) montre que l'ARNm de ASIC est bien exprimé dans les petits neurones du ganglion

de la racine dorsale, ce qui supporte le fait que ASIC est le canal cationique activé par les protons rapidement désensibilisant décrit dans les neurones sensoriels nociceptifs. Alors que la présence de canaux cationiques
 5 activés par les protons dans le ganglion de la racine dorsale est en accord avec leur fonction de détecteur de l'acidité dans la nociception, leur rôle dans le cerveau reste à établir. Les résultats d'hybridation *in situ* de la figure 8c montrent une expression large et hétérogène de
 10 l'ARNm du canal ASIC. Les niveaux d'expression les plus élevés ont été observés dans le bulbe olfactif principal, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'habenula, le noyau amygdaloïde basolatéral et le cerebellum. L'activité synaptique s'accompagne de changements du pH
 15 extracellulaire (22, 23) et les changements localisés rapides de pH dans ou à proximité de la fente synaptique sont sensiblement plus saturés et forts que les fluctuations macroscopiques du pH rapportées.

Les canaux cationiques activés par les
 20 protons sont les seuls canaux ioniques connus qui sont directement activés par un changement du pH et il a été envisagé que les fluctuations extracellulaires du pH jouent un rôle neuromodulateur (23). L'expression de canaux cationiques dans le cerveau supporte en outre
 25 l'hypothèse que les fluctuations de pH ne sont pas seulement une activation neuronale par un produit, mais davantage un chemin de communication dans le système nerveux central.

Outre les canaux cationiques activés par les
 30 protons rapidement inactivés, il a été rapporté la présence dans les neurones sensoriels de canaux cationiques activés par les protons présentant des cinétiques plus lentes (4, 24). Les canaux cationiques activés par les protons forment probablement, comme
 35 d'autre canaux cationiques activés par un ligand (25, 26),

une famille de canaux cationiques où différentes sous-unités ou combinaisons de sous-unités constituent les canaux avec diverses propriétés pharmacologiques et biophysiques.

5 La sensation de l'acidité n'est pas
uniquement impliquée dans la nociception, mais est aussi
associée à la transduction du goût (2). Les stimulations
acides activent les canaux cationiques activés par les
protons dans les cellules du goût (2, 27) et l'amiloride
10 inhibe la perception du goût acide (2). Aussi, les données
tant physiologiques que pharmacologiques indiquent que
ASIC et d'autres membres de cette famille sont impliqués
dans la transduction du goût. Il est en effet
particulièrement frappant que la même classe de canaux
15 ioniques soit associée à différentes facettes de la
perception sensorielle :

- Les canaux sodium sensibles à l'amiloride
sont associés à la transduction du goût salé (2).

20 - Les dégénérines de *C. elegans* sont
impliquées dans la mécanotransduction et ont été proposées
comme formant des canaux ioniques mécanosensibles (28,
29).

- les canaux ASIC sont impliqués dans la
nociception et dans la transduction du goût acide.

25 Le clonage du canal ASIC permet de disposer
d'un nouvel outil d'investigation de ce groupe de canaux
ioniques et de développer des bloquants spécifiques
trouvant leur utilisation notamment comme analgésiques.

Liste des références

1. Rang, H.P., Bevan, S. & Dray, A. *Br. Med. Bull.* **47**, 534-548 (1991).
2. Lindemann, B. *Physiol. Rev.* **76**, 718-766 (1996).
3. Krishtal, O.A. & Pidoplichko, V.I. *Neuroscience* **6**, 2599-2601 (1981).
4. Bevan, S. & Geppetti, P. *Trends Neurosci.* **17**, 509-512 (1994).
5. Akaike, N., Krishtal, O.A. & Maruyama, T. *J. Neurophysiol.* **63**, 805-813 (1990).
6. Canessa, C.M., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* **361**, 467-470 (1993).
7. Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* **367**, 463-467 (1994).
8. Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Febs Lett.* **318**, 95-99 (1993).
9. Lingueglia, E., Renard, S., Waldmann, R., Voilley, N., Champigny, G., Plass, H., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* **269**, 13736-13739 (1994).
10. Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Nature* **378**, 730-733 (1995).
11. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* **270**, 27411-27414 (1995).
12. Driscoll, M. & Chalfie, M. *Nature* **349**, 588-593 (1991).
13. Huang, M. & Chalfie, M. *Nature* **367**, 467-470 (1994).
14. Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* **271**, 10433-10434 (1996).
15. Kovalchuk Yu, N., Krishtal, O.A. & Nowycky, M.C. *Neurosci. Lett.* **115**, 237-242 (1990).
16. Konnerth, A., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* **386**, 603-633 (1987).
17. Davies, N.W., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* **400**, 159-187 (1988).
18. Korkushko, A. O. & Krishtal, O.A. *Neirofiziologiya* **16**, 557-561 (1984).
19. Grantyn, R., Perouansky, M., Rodriguez-Tebar, A. & Lux, H.D. *Dev. Brain Res.* **49**, 150-155 (1989).

20. Price, M.P., Snyder, P.M. & Welsh, M.J. *J. Biol. Chem.* 271, 7879-7882 (1996).
21. Akaike, N. & Ueno, S. *Prog. Neurobiol.* 43, 73-83 (1994).
22. Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N. & Smirnov, S.V. *Brain Res.* 436, 352-356 (1987).
23. Chesler, M. & Kaila, K. *Trends Neurosci.* 15, 396-402 (1992).
24. Bevan, S. & Yeats, J. *J. Physiol.* 433, 145-161 (1991).
25. Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. & Surprenant, A. *Nature* 377, 432-435 (1995).
26. Barnard, E.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 305 - 309 (1996).
27. Okada, Y., Miyamoto, T. & Sato, T. *J. Exp. Biol.* 187, 19-32 (1994).
28. Liu, J., Schrank, B. & Waterston, R. *Science* 273, 361 (1996).
29. Waldmann, R., Champigny, G. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 11735-11737 (1995).
30. Renard, S., Lingueglia, E., Voilley, N., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 12981-12986 (1994).

LISTE DE SÉQUENCES.

NOMBRE DE SÉQUENCES : 3

5 INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:1 :

- i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SEQUENCE :
- A) LONGUEUR : 3562 paires de base
- B) TYPE : acide nucléique
- 10 C) NOMBRE DE BRINS : double
- D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

- 15 ix) CARACTÉRISTIQUE
- A) NOM/CLE : ASIC
- B) LOCALISATION : 123 .. 1700

20 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:1 :

	CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACAGAAC CTGCGCCTGT	60
	GCCTGTGCCT GTGCCTGTGC CTGTTTGAGA GCTGGAGACA CAGAAGGATC CCCTTGCAA	120
25	GG ATG GAA TTG AAG ACC GAG GAG GAG GAG GTG GGT GGT GTC CAG CCG	167
	Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro	
	1 5 10 15	
30	GTG AGC ATC CAG GCT TTC GCC AGC AGC TCC ACG CTG CAT GGT CTT GCC	215
	Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala	
	20 25 30	
35	CAC ATC TTC TCC TAT GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG GCC	263
	His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala	
	35 40 45	
40	CTG TGC TTC CTG GGT TCG CTG GCC GTC CTG CTG TGT GTG TGC ACT GAG	311
	Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu	
	50 55 60	
45	CGT GTG CAG TAC TAC TTC TGC TAT CAC CAC GTC ACC AAG CTT GAC GAA	359
	Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp Glu	
	65 70 75	
50	GTG GCT GCC TCC CAG CTC ACC TTC CCT GCT GTC ACA CTG TGC AAT CTC	407
	Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu	
	80 85 90 95	
55	AAT GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAC CAT GCT	455
	Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His Ala	
	100 105 110	

	GGG	GAG	CTG	CTG	GCC	CTG	CTC	AAC	AAC	AGG	TAT	GAG	ATC	CCG	GAC	ACA	503
	Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Asn	Asn	Arg	Tyr	Glu	Ile	Pro	Asp	Thr	
				115					120					125			
5	CAG	ATG	GCT	GAT	GAA	AAG	CAG	CTA	GAG	ATA	TTG	CAG	GAC	AAG	GCC	AAC	551
	Gln	Met	Ala	Asp	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu	Ile	Leu	Gln	Asp	Lys	Ala	Asn	
			130					135					140				
10	TTC	CGG	AGC	TTC	AAG	CCC	AAG	CCC	TTC	AAC	ATG	CGT	GAA	TTC	TAC	GAC	599
	Phe	Arg	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Pro	Phe	Asn	Met	Arg	Glu	Phe	Tyr	Asp	
		145					150					155					
15	AGA	GCG	GGG	CAC	GAT	ATT	CGA	GAC	ATG	CTG	CTC	TCG	TGC	CAC	TTC	CGT	647
	Arg	Ala	Gly	His	Asp	Ile	Arg	Asp	Met	Leu	Leu	Ser	Cys	His	Phe	Arg	
	160					165					170					175	
20	GGG	GAG	GCC	TGC	AGC	GCT	GAA	GAT	TTC	AAA	GTG	GTC	TTC	ACT	CGG	TAT	695
	Gly	Glu	Ala	Cys	Ser	Ala	Glu	Asp	Phe	Lys	Val	Val	Phe	Thr	Arg	Tyr	
					180					185					190		
25	GGG	AAG	TGT	TAC	ACA	TTC	AAC	TCG	GGC	CAA	GAT	GGG	CGG	CCA	CGG	CTG	743
	Gly	Lys	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Gly	Gln	Asp	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu	
				195					200					205			
30	AAG	ACC	ATG	AAA	GGT	GGG	ACT	GGC	AAT	GGC	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	791
	Lys	Thr	Met	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	
			210					215					220				
35	ATT	CAG	CAA	GAT	GAA	TAT	TTG	CCT	GTG	TGG	GGA	GAG	ACC	GAC	GAG	ACA	839
	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	Thr	
		225					230					235					
40	TCC	TTC	GAA	GCA	GGC	ATC	AAA	GTG	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	GAT	GAA	CCC	887
	Ser	Phe	Glu	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	Pro	
	240					245					250					255	
45	CCT	TTC	ATC	GAC	CAG	CTG	GGC	TTT	GGT	GTG	GCT	CCA	GGT	TTC	CAG	ACG	935
	Pro	Phe	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	
					260					265					270		
50	TTT	GTG	TCT	TGC	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ATC	TAC	CTG	CCC	TCA	CCC	TGG	983
	Phe	Val	Ser	Cys	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Pro	Ser	Pro	Trp	
				275					280					285			
55	GGC	ACC	TGC	AAT	GCT	GTT	ACC	ATG	GAC	TCG	GAT	TTC	TTC	GAC	TCC	TAC	1031
	Gly	Thr	Cys	Asn	Ala	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Asp	Phe	Phe	Asp	Ser	Tyr	
			290					295					300				
60	AGC	ATC	ACT	GCC	TGC	CGG	ATT	GAT	TGC	GAG	ACG	CGT	TAC	CTG	GTG	GAG	1079
	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	Glu	
		305					310					315					
65	AAC	TGC	AAC	TGC	CGT	ATG	GTG	CAC	ATG	CCA	GGG	GAC	GCC	CCA	TAC	TGC	1127
	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Tyr	Cys	
	320					325					330					335	

	ACT CCA GAG CAG TAC AAG GAG TGT GCA GAT CCT GCC CTG GAC TTC CTA	1175
	Thr Pro Glu Gln Tyr Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu	
	340 345 350	
5	GTG GAG AAA GAC CAG GAA TAC TGC GTG TGT GAG ATG CCT TGC AAC CTG	1223
	Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu	
	355 360 365	
10	ACC CGC TAC GGC AAG GAG CTG TCC ATG GTC AAG ATC CCA AGC AAA GCC	1271
	Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala	
	370 375 380	
15	TCC GCC AAG TAC CTG GCC AAG AAG TTC AAC AAA TCG GAG CAG TAC ATA	1319
	Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu Gln Tyr Ile	
	385 390 395	
20	GGG GAG AAC ATT CTG GTG CTG GAC ATT TTC TTT GAA GTC CTC AAC TAT	1367
	Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val Leu Asn Tyr	
	400 405 410 415	
25	GAG ACC ATC GAG CAG AAA AAG GCC TAT GAG ATC GCA GGG CTG TTG GGT	1415
	Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu Gly	
	420 425 430	
30	GAC ATC GGG GGC CAG ATG GGG TTG TTC ATC GGT GCC AGC ATC CTC ACC	1463
	Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr	
	435 440 445	
35	GTG CTG GAA CTC TTT GAC TAT GCC TAC GAG GTC ATT AAG CAC AGG CTG	1511
	Val Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu	
	450 455 460	
40	TGC AGA CGT GGA AAG TGC CAG AAG GAG GCT AAG AGG AGC AGC GCA GAC	1559
	Cys Arg Arg Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp	
	465 470 475	
45	AAG GGC GTG GCG CTC AGC CTG GAT GAC GTC AAA AGA CAC AAT CCC TGC	1607
	Lys Gly Val Ala Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys	
	480 485 490 495	
50	GAG AGC CTC CGA GGA CAT CCT GCC GGG ATG ACG TAC GCT GCC AAC ATC	1655
	Glu Ser Leu Arg Gly His Pro Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile	
	500 505 510	
55	CTA CCT CAC CAT CCC GCT CGA GGC ACG TTT GAG GAC TTT ACC TGC TAA	1703
	Leu Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr Phe Glu Asp Phe Thr Cys *	
	515 520 526	
50	GCCCTCGCAG GCCGCTGTAC CAAAGGCCTA GGTGGGGAGG GCTGGGGGAG CAAGGGGCCC	1763
	CCAACTGCCC CCAGCTACCC TGTGGACTTA ACTGCATTCC TGGTCAGTGG TTCCCTCTTG	1823
	TCTGTGGTGA GAAAGGAGTC TTGACCATAG AGTCCTCTCC CAGCCTCTAT CCCATCTTTT	1943
55	TATTTTAATT TAATCACATT TGCTCTGTAA TATTGCTTGA GGCTGGGGAT CGTGATTTC	2003
	CCCCAGTTCT TTTATTGTTG AGAATAGTTT TCTCTATTCT GGGTTTTCTG TTATTTCAAA	2063

	TGAATCTGCA	AATTGCTCTT	CCCATCTCTA	TGAAGAATTG	CGTTGGAATT	TTGATGGGGA	2123
	TTGTATTGAA	TCTGTAGATT	GCCTTTGGTA	AGATGGCCAT	TTTTACTATG	TTAATCCTGC	2183
5	CAATTCATGA	GCAAGGGAGA	TCTTTCTATC	TCTGAAATCT	ACTTCAGTTT	CTTTCTTCAG	2243
	AGACTTGAAG	TTCTTGTCAT	AAAAATCTTT	TTGGTTAGAG	CCACACCAAG	GTATTTTATA	2303
10	TTGTTTGTGA	CTATTGTGAA	TGGTGTCAAT	TCCCTAATTT	CCTTCTCAGC	CTACTTATCC	2363
	TTTGAGTAGA	GGAAGGCTTC	TGATTTGTTT	GGGTTAATTT	TATACCCAGC	TGCTTTGCTA	2423
	AAGTTCTTTA	TCAGGTTTAG	GTGTTCTCTG	GTGGAACCTT	TGGGGTCACG	TAAGAATACT	2483
15	ATTATATCAT	CTGCAAATAG	TGATATTTCA	CTTCTTCCTT	TCCAATTTCT	ATCCCTCTGG	2543
	GGACTTTTTG	TTGTCTAATT	GCTCTGGCTA	GGACTTCAAA	TTCTATATTG	AATAGATAGG	2603
20	GAGAGAGTGG	GCAGCCTTGT	CTAGTTCCTG	GTTTTCGTGG	GATCGCTTCA	AATTTCTCTC	2663
	CATTTAGTTT	GATATTGGCT	ACTGGTTTGC	TGTATATGGC	TTTTACTGTA	CTTAGGTATG	2723
	GGCCTTGAAT	TCCTGATATT	TCCAAGACTT	TTAACATGAA	GGGGTTTTGA	AATTTGCCAA	2783
25	ATGCTTTCTC	AGCATCTAAT	GAGATGATCA	TGTGCCCTCC	CCCCACCTTG	AGTTTGTTTA	2843
	TATAGTGGGT	TACATGAAAG	GATCATTTCT	AATAGTCCAC	AAGTCTGCCA	AATCTTGCTG	2903
	ATTGTGACTC	ATTTCCATAG	CAGGCTCTAT	AACTTCTCTA	ACAGATTGCA	TTAAACTCTG	2963
30	CTTGGGGAAG	GCATTACCTC	TTGGTTGAAG	CAATGTTGTA	GTTTCTATGC	CTGCTGAGTA	3023
	AATAGCCTCA	AGTCCAAGTA	CTTGCCCAGA	CTAATGATCA	AACGTATCCA	GGAGTTCCAT	3083
35	ACCAGAGATG	TACTCTTCTC	TCCTTTGAAG	TACATTGCTG	GAAGAGTAAT	TGTGTTTGCT	3143
	AGAGATACTC	CTTCGAACTG	CAAAAGAAAT	CTCTTGGCTA	AGCATATAAT	CAAGCCTCAG	3203
40	GTTTTCTTTT	TATTAAATAG	CTGCTTGTA	GAAAGTGGAC	ACTAAGCATA	TACCTCAAAG	3263
	GGAGACAGAA	TGACTCTGTG	CCTTCACTGA	TGGAAGTCTG	GGTTACAAAT	TACATCAGAA	3323
	GAACCTATCA	TAGTGAAACA	TCTCATTCCC	CTGGTATAAT	CCCTTCTAGA	AATACACTTG	3383
45	TGACTCTGAA	ATGTTATAAT	CGTGACAAC	AGGCTGTTAC	AGATACACCA	AGTTAAATTT	3443
	GATAGAGAAA	CCAGGCTTGG	AGCCTCATGT	CCATAGGGCA	AGAGGAAGAT	GCTGAGTGTT	3503
50	TAAGGTTGGT	TTGAGCGAAG	AACAATACCT	TGTGTCACAA	AAATGAAAGG	AAAAAAGAAA	3563
	AAAGGAAAGA	AGGAAAGAAA	GAGAGAGAAA	GAAAAAGAAA	GAAAGAAAAA	AAAAAAGAAA	3562

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:2 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

5 A) LONGUEUR : 1620 paires de base
 B) TYPE : acide nucléique
 C) NOMBRE DE BRINS : double
 D) CONFIGURATION : linéaire

10 ii) TYPE DE MOLECULE : ADN
 vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE
 A) NOM/CLE : ASIC
 B) LOCALISATION : 1 .. 1542

15 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:2 :

20	CCG GTG AGC ATC CAG GCC TTC GCC AGC AGC TCC ACA CTG CAC GGC ATG Pro Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met 1 5 10 15	48
25	GCC CAC ATC TTC TCC TAC GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG Ala His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp 20 25 30	96
30	GCC CTG TGC TTC CTG GGC TCG CTG GCT GTG CTG CTG TGT GTG TGC ACG Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr 35 40 45	144
35	GAG CGT GTG CAG TAC TAC TTC CAC TAC CAC CAT GTC ACC AAG CTC GAC Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp 50 55 60	192
40	GAG GTG GCT GCC TCT CAG CTT ACC TTC CCT GCT GTC ACG CTG TGC AAC Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn 65 70 75 80	240
45	CTC AAC GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAT CAT Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His 85 90 95	288
50	GCT GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATA CCA GAC Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp 100 105 110	336
55	ACA CAG ATG GCA GAT GAA AAG CAG CTG GAG ATA CTG CAG GAC AAA GCC Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala 115 120 125	384
60	AAC TTC CGC AGC TTC AAA CCC AAA CCC TTC AAC ATG CGT GAG TTC TAC Asn Phe Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr 130 135 140	432
65	GAC CGA GCT GGG CAC GAC ATT CGA GAC ATG CTG CTC TCC TGC CAC TTC Asp Arg Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe 145 150 155 160	480

	CGG	GGG	GAG	GTC	TGC	AGC	GCT	GAA	GAC	TTC	AAG	GTG	GTC	TTC	ACA	CGC	528
	Arg	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Glu	Asp	Phe	Lys	Val	Val	Phe	Thr	Arg	
					165					170					175		
5	TAT	GGA	AAG	TGC	TAC	ACG	TTC	AAC	TCG	GGC	CGA	AAT	GGG	CGG	CCG	CGG	576
	Tyr	Gly	Lys	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Gly	Arg	Asn	Gly	Arg	Pro	Arg	
				180					185					190			
10	CTG	AAG	ACC	ATG	AAG	GGT	GGG	ACG	GGC	AAT	GGG	CTG	GAA	ATC	ATG	CTG	624
	Leu	Lys	Thr	Met	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	
			195					200					205				
15	GAC	ATC	CAG	CAG	GAC	GAG	TAC	CTG	CCT	GTG	TGG	GGG	GAG	ACT	GAC	GAG	672
	Asp	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	
		210					215					220					
20	ACG	TCT	TTC	GAA	GCA	GGC	ATC	AAA	GTG	CAG	ATC	CAT	AGT	CAG	GAT	GAA	720
	Thr	Ser	Phe	Glu	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	
						230					235					240	
25	CCT	CCT	TTC	ATC	GAC	CAG	CTG	GGC	TTT	GGC	GTG	GCC	CCA	GGC	TTC	CAG	768
	Pro	Pro	Phe	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	
					245					250					255		
30	ACC	TTT	GTG	GCC	TGC	CAG	GAG	CAG	CGG	CTC	ATA	TAC	CTG	CCC	CCA	CCC	816
	Thr	Phe	Val	Ala	Cys	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	
				260					265					270			
35	TGG	GGC	ACC	TGC	AAA	GCT	GTT	ACC	ATG	GAC	TCG	GAT	TTG	GAT	TTC	TTC	864
	Trp	Gly	Thr	Cys	Lys	Ala	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Asp	Leu	Asp	Phe	Phe	
			275					280					285				
40	GAC	TCC	TAC	AGC	ATC	ACT	GCC	TGC	CGC	ATC	GAC	TGT	GAG	ACG	CGC	TAC	912
	Asp	Ser	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	
		290					295					300					
45	CTG	GTG	GAG	AAC	TGC	AAC	TGC	CGC	ATG	GTG	CAC	ATG	CCA	GGG	GAT	GCC	960
	Leu	Val	Glu	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	
						310					315					320	
50	CCA	TAC	TGT	ACT	CCA	GAG	CAG	TAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAT	CCT	GCT	CTG	1008
	Pro	Tyr	Cys	Thr	Pro	Glu	Gln	Tyr	Lys	Glu	Cys	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	
					325					330					335		
55	GAC	TTC	CTG	GTG	GAG	AAG	GAC	CAG	GAG	TAC	TGC	GTG	TGT	GAA	ATG	CCT	1056
	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Lys	Asp	Gln	Glu	Tyr	Cys	Val	Cys	Glu	Met	Pro	
				340					345					350			
60	TGC	AAC	CTG	ACC	CGC	TAT	GGC	AAA	GAG	CTG	TCC	ATG	GTC	AAG	ATC	CCC	1104
	Cys	Asn	Leu	Thr	Arg	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	
				355				360					365				
65	AGC	AAA	GCC	TCA	GCC	AAG	TAC	CTG	GCC	AAG	AAG	TTC	AAC	AAA	TCT	GAG	1152
	Ser	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Lys	Ser	Glu	
			370				375					380					

	CAA TAC ATA GGG GAG AAC ATC CTG GTG CTG GAC ATT TTC TTT GAA GTC	1200
	Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val	
	385 390 395 400	
5	CTC AAC TAT GAG ACC ATT GAA CAG AAG AAG GCC TAT GAG ATT GCA GGG	1248
	Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly	
	405 410 415	
10	CTC CTG GGT GAC ATC GGG GGC CAG ATG GGG CTG TTC ATC GGG GCC AGC	1296
	Leu Leu Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser	
	420 425 430	
15	ATC CTC ACG GTG CTG GAG CTC TTT GAC TAC GCC TAC GGG GTC ATT AAG	1344
	Ile Leu Thr Val Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Gly Val Ile Lys	
	435 440 445	
20	CAC AAG CTG TGC CGA CGA GGA AAA TGC CAG AAG GAG GCC AAA AGG AGC	1392
	His Lys Leu Cys Arg Arg Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser	
	450 455 460	
25	AGT GCG GAC AAG GGC GTG GCC CTC AGC CTG GAC GAC GTC AAA AGA CAC	1440
	Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His	
	465 470 475 480	
30	AAC CCG TGC GAG AGC CTT CGG GGC CAC CCT GCC GGG ATG ACA TAC GCT	1488
	Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro Ala Gly Met Thr Tyr Ala	
	485 490 495	
35	GCC AAC ATC GTA CCT CAC CAT CCG GCC CGA GGC ACG TTC GAG GAC TTT	1536
	Ala Asn Ile Val Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr Phe Glu Asp Phe	
	500 505 510	
35	ACC TGC TGA GCCCGCAGG CCGCCGAACC AAAGACCTAG ATGGGGAGGA CTAGGAGAGC	1595
	Thr Cys *	
	514	
	GAGGGGGCCC CCAGCTGCCT CCTAA	1620

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:3 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

5 A) LONGUEUR : 1666 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

10 ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : MDEG

15 B) LOCALISATION : 127 .. 1663

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:3 :

	TCTGGCGCGA TGCTTACCTT GCGTTCTCTC CCCTGAACGT CAAGGTTTAA GCAGAGCCCG	60
20	AGGACTGGGA GCTCTTCTCT GAAATTCGAT CAACCTGAAG CCAGTTGCGG AACTGCACGG	120
	GGTCCCG ATG GAC CTC AAG GAA AGC CCC AGT GAG GGC AGC CTG CAA CCT	169
	Met Asp Leu Lys Glu Ser Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Pro	
	1 5 10	
25	TCT AGC ATC CAG ATC TTT GCC AAC ACC TCC ACC CTC CAT GGC ATC CGC	217
	Ser Ser Ile Gln Ile Phe Ala Asn Thr Ser Thr Leu His Gly Ile Arg	
	15 20 25 30	
30	CAC ATC TTC GTG TAT GGG CCG CTG ACC ATC CGG CGT GTG CTG TGG GCA	265
	His Ile Phe Val Tyr Gly Pro Leu Thr Ile Arg Arg Val Leu Trp Ala	
	35 40 45	
35	GTG GCC TTC GTG GGC TCT CTG GGC CTG CTG CTG GTG GAG AGC TCT GAG	313
	Val Ala Phe Val Gly Ser Leu Gly Leu Leu Leu Val Glu Ser Ser Glu	
	50 55 60	
40	AGG GTG TCC TAC TAC TTC TCC TAC CAG CAT GTC ACT AAG GTG GAC GAA	361
	Arg Val Ser Tyr Tyr Phe Ser Tyr Gln His Val Thr Lys Val Asp Glu	
	65 70 75	
45	GTG GTG GCT CAA AGC CTG GTC TTC CCA GCT GTG ACC CTC TGT AAC CTC	409
	Val Val Ala Gln Ser Leu Val Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu	
	80 85 90	
50	AAT GGC TTC CGG TTC TCC AGG CTC ACC ACC AAC GAC CTG TAC CAT GCT	457
	Asn Gly Phe Arg Phe Ser Arg Leu Thr Thr Asn Asp Leu Tyr His Ala	
	95 100 105 110	
55	GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTG GAT GTC AAC CTG CAG ATC CCG GAC CCC	505
	Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asp Val Asn Leu Gln Ile Pro Asp Pro	
	115 120 125	
55	CAT CTG GCT GAC CCC TCC GTG CTG GAG GCC CTG CGG CAG AAG GCC AAC	553
	His Leu Ala Asp Pro Ser Val Leu Glu Ala Leu Arg Gln Lys Ala Asn	
	130 135 140	

	TTC	AAG	CAC	TAC	AAA	CCC	AAG	CAG	TTC	AGC	ATG	CTG	GAG	TTC	CTG	CAC	601
	Phe	Lys	His	Tyr	Lys	Pro	Lys	Gln	Phe	Ser	Met	Leu	Glu	Phe	Leu	His	
			145					150					155				
5	CGT	GTG	GGC	CAT	GAC	CTG	AAG	GAT	ATG	ATG	CTC	TAC	TGC	AAG	TTC	AAA	649
	Arg	Val	Gly	His	Asp	Leu	Lys	Asp	Met	Met	Leu	Tyr	Cys	Lys	Phe	Lys	
		160					165					170					
10	GGG	CAG	GAG	TGC	GGC	CAC	CAA	GAC	TTC	ACC	ACA	GTG	TTT	ACA	AAA	TAT	697
	Gly	Gln	Glu	Cys	Gly	His	Gln	Asp	Phe	Thr	Thr	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	
	175					180					185					190	
15	GGG	AAG	TGT	TAC	ATG	TTT	AAC	TCA	GGC	GAG	GAT	GGC	AAA	CCT	CTG	CTC	745
	Gly	Lys	Cys	Tyr	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	
					195					200					205		
20	ACC	ACG	GTC	AAG	GGG	GGG	ACA	GGC	AAC	GGG	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	793
	Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	
				210					215					220			
25	ATT	CAG	CAG	GAT	GAG	TAC	CTG	CCC	ATC	TGG	GGA	GAG	ACA	GAG	GAA	ACG	841
	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Trp	Gly	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	
			225					230						235			
30	ACA	TTT	GAA	GCA	GGA	GTG	AAA	GTT	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	TCT	GAG	CCA	889
	Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Ser	Glu	Pro	
		240					245					250					
35	CCT	TTC	ATC	CAA	GAG	CTG	GGC	TTT	GGG	GTG	GCT	CCA	GGG	TTC	CAG	ACC	937
	Pro	Phe	Ile	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	
	255					260					265					270	
40	TTT	GTG	GCC	ACA	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ACA	TAC	CTG	CCC	CCA	CCG	TGG	985
	Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	
					275					280					285		
45	GGT	GAG	TGC	CGA	TCC	TCA	GAG	ATG	GGC	CTC	GAC	TTT	TTT	CCT	GTT	TAC	1033
	Gly	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Val	Tyr	
				290					295					300			
50	AGC	ATC	ACC	GCC	TGT	AGG	ATT	GAC	TGT	GAG	ACC	CGC	TAC	ATT	GTG	GAA	1081
	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	
			305					310					315				
55	AAC	TGC	AAC	TGC	CGC	ATG	GTT	CAC	ATG	CCA	GGG	GAT	GCC	CCT	TTT	TGT	1129
	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe	Cys	
		320					325					330					
60	ACC	CCT	GAG	CAG	CAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAG	CCT	GCC	CTA	GGT	CTG	TTG	1177
	Thr	Pro	Glu	Gln	His	Lys	Glu	Cys	Ala	Glu	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	
	335					340					345					350	
65	GCG	GAA	AAG	GAC	AGC	AAT	TAC	TGT	CTC	TGC	AGG	ACA	CCC	TGC	AAC	CTA	1225
	Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Tyr	Cys	Leu	Cys	Arg	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	
					355					360					365		

40

REVENDECATIONS

5 1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons.

10 2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ IS No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15 3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

20 4) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

25 5) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons.

30 6) Canal cationique hybride selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite seconde protéine est une protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

7) Canal cationique hybride selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est constitué de l'association de deux protéines constituant un canal ionique activé par les protons, la première desdites protéines ayant la séquence en acides aminés qui est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine, et la seconde desdites protéines ayant la séquence en acides aminés qui est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3.

8) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou contre au moins un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.

9) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

10) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 9 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence complémentaire.

11) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 9 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence complémentaire.

12) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 9 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 127 et 1663 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3, ou sa séquence complémentaire.

13) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

14) Procédé de production d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 9 à 12 ou un vecteur selon la revendication 13 dans un hôte cellulaire,
- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,
- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

15) Procédé d'expression d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 9 à 12 ou un vecteur selon la revendication 13 dans ledit hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

16) Procédé selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

17) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride et activés par les protons, obtenue par le procédé selon l'une des revendications 14 à 16.

18) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux ioniques neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 17, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les protons.

19) Procédé selon la revendication 18 appliqué au criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût.

20) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou un canal hybride selon l'une quelconque 5 à 7 ou encore un anticorps selon la revendication 8.

dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal ASIC et/ou ses dérivés.

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC est celle représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Une autre molécule d'ADN selon l'invention est celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2 ou sous le numéro SEQ ID NO : 3, ou leur séquence complémentaire.

Des molécules d'acide nucléique selon l'invention comprennent ou sont constituées par :

- la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence complémentaire ;

- la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence complémentaire ;

- la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 127 et 1663 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3, ou sa séquence complémentaire ;

L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal ionique selon l'invention. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie

REVENDICATIONS

5 1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons, à l'exclusion de la protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3.

10 2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15 3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

20 4) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons.

25 5) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

~~Feuille rectifiée~~
Feuille avant rectification
/2ème

5 6) Canal cationique hybride selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué de l'association de deux protéines constituant un canal ionique activé par les protons, la première desdites protéines ayant la séquence en acides aminés qui est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, SEQ ID No : 2 ou SEQ ID No : 3 ou des dérivés fonctionnellement équivalents de ces protéines, et la seconde desdites protéines ayant la
10 séquence en acides aminés qui est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3.

15 7) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et/ou contre la protéine dont la séquence est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No. : 3 et/ou contre au moins un canal hybride selon l'une quelconque des revendications
20 4 à 6.

25 8) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, à l'exclusion de la molécule d'acide nucléique dont la séquence en nucléotides est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No. : 3.

30 9) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 8 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence
35 complémentaire.

10) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 8 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence complémentaire.

11) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

12) Procédé de production d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 8 à 10 ou un vecteur selon la revendication 11 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

13) Procédé d'expression d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 8 à 10 ou un vecteur selon la revendication 11 dans ledit hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

14) Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

15) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride et activés par les protons, obtenue par le procédé selon l'une des revendications 12 à 14.

16) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux ioniques neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 15, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les protons.

17) Procédé selon la revendication 16 appliqué au criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût.

18) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque 4 à 6 ou encore un anticorps selon la revendication 7.

5 6) Canal cationique hybride selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué de l'association de deux protéines constituant un canal ionique activé par les protons, la première desdites protéines ayant la séquence en acides aminés qui est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, SEQ ID No : 2 ou des dérivés fonctionnellement équivalents de ces protéines, et la
10 seconde desdites protéines ayant la séquence en acides aminés qui est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3.

15 7) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et/ou contre la protéine dont la séquence est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No. : 3 et/ou contre au moins un canal hybride selon l'une quelconque des revendications
20 4 à 6.

25 8) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, à l'exclusion de la molécule d'acide nucléique dont la séquence en nucléotides est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No. : 3.

30 9) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 8 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence
35 complémentaire.

Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro Val Ser Ile
Pro Val Ser Ile

Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala His Ile Phe Ser Tyr
Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met Ala His Ile Phe Ser Tyr

Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu
Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu

Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His
Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His

His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val
His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val

Thr Leu Cys Asn Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu
Thr Leu Cys Asn Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu

Tyr His Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp
Tyr His Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp

Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe
Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe

Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg Ala Gly
Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg Ala Gly

His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly Glu Ala Cys Ser
His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly Glu Val Cys Ser

Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn
Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn

Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn
Ser Gly Arg Asn Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn

Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly
Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly

Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln
Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln

Asp Glu Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln
Asp Glu Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln

Fig. 1

Thr Phe Val Ser Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp Gly
Thr Phe Val Ala Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Pro Pro Trp Gly

Thr Cys Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser
Thr Cys Lys Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Leu Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser

Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn
Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn

Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr
Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr

Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr
Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr

Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met
Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met

Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys
Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys

Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val
Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val

Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu
Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu

Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val
Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val

Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu Cys Arg Arg
Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Gly Val Ile Lys His Lys Leu Cys Arg Arg

Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu
Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu

Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro
Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro

Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr
Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Val Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr

Phe Glu Asp Phe Thr Cys
Phe Glu Asp Phe Thr Cys

Fig. 1 (suite)

FaNaCh 1 M K Y T S A A T K P G V F P E H H O H A M M R N R Y H P H C N Y
 MEC-4 1 M S W M O N L K N Y O H L R D P S E Y M S O V Y G D P L A Y L O E N T K F V T E R E Y Y E D F G Y G E C F N S S E S E V

M I

ASIC 1 M L K T E E E E V G G Q P V S I Q A F A S S T L H G L A H I F S Y E R L S R A L W A C F G S L
 MDEG 1 M D L K E S P S E G S O P S S I O I F A N S T L H G I R H I F V Y P L T R R V L W A A F V G S L
 FaNaCh 34 S D N R S A T D F I A E L S E S N A H G A K I V T S R D T K R V L W A L V G F
 MEC-4 61 O C E L I T G F D P K L L P Y D K R L A W H F K E F C Y K S A H G I P M I G E A P N V Y R A V V M L F G G C M

ASIC 55 L L C V C E R V Q Y Y F C Y H H V T K I D E V A A S O L T F P A V T L C N L N E F R F S Q V S K N D L Y H A G
 MDEG 54 L L C V C E R V S Y Y F S Y O H V T K I D E V A A S L V F P A V T L C N L N G F R F S R T N D L Y H A G
 FaNaCh 79 T A A T L S L L V R K Y L Q V V E L S I K D S M P Q O P S V S C H E P I S L R T I R R . . . Y F N N
 MEC-4 120 I L L Y E N A O S V D K Y N R N E K V D L O L K F D T N P P A T L C N L N P K A S L A T S V D L V R T L S

ASIC 113 E L L A L L N N R Y I P D T O M A D E K O L E I L O D K A N F R
 MDEG 112 E L L A L L D V N L I P D P R A D P V L E L R O K A N F K
 FaNaCh 135 E S O N L T W L R F I O K F F E O D S F I N S R A F Y E N L
 MEC-4 359 E N W Y L O G G T P T E D P N F L E A M G F D I T D E V A I V

ASIC 146 S K P K P F N M R E F Y D R A G H D L D M L S C F F G B A C S A E D F K V V F T Y G K C Y T F
 MDEG 145 H K P K P F S M E F L H R G H D L D M L Y C F F G G E C G H D F T V F T Y G K C Y M F
 FaNaCh 168 G O D A K K L S H N L E D M H C R F N R L C H V S N F T F F D G N Y F N C T F
 MEC-4 419 T K A K E N I M F A M A T L S G D R E R L S T T K E H K C S F N G K A C D I E A D F L T H I D P V G S C T F

ASIC 198 N S G D G P R L K T K G G T G N G L E I M L D I O Q D E Y L P W G E T D E T F E A G K V O I H S O D
 MDEG 197 N S G D G P L L T T K G G T G N G L E I M L D I O Q D E Y L P W G E T D E T F E A G K V O I H S O S
 FaNaCh 212 N S G R L O M H A T G P E N G L S F S K D P L P G T Y G A Y N F D N N I L H S A G V V V H A P G
 MEC-4 479 N H R T V N L T S R A G P M Y G L R Y Y A S Y A P T T E A G V R T I H D K E

ASIC 254 E P P F I D L G F G V A P G F O T F V S C O E O R L I Y L P S P W G T C N A V T M D S O F F D S Y S I T A C R I
 MDEG 253 E P P F I O L G F G V A P G F O T F V T O E O R L T Y L P P P W G E C R S E N G L D F F P V Y S I T A C R I
 FaNaCh 268 S M P S P V H G I D P P G Y S S V G L K A I L H T R L P Y P Y G N C T N D M N G I K O Y K V F F A C L O
 MEC-4 526 D F P P D T F G S A P T G V S F L R L R K S R L P A P Y G D C V P D G K T S D V I Y S N Y E V S V E S C Y R

Fig. 2

```

ASIC 311 DCETRYLVENCNCRMVHMPGDAP.....CTPEQ
MDEG 310 DCETRYLVENCNCRMVHMPGDAP.....CTPEQ
FaNaCh 325 LCKORLIIRRCGCSSA LPEVPS NATFCGVIKDWOEINRNHSNEDHNOSEEDRAFIPTP
MEC-4 586 SCFOOLIKKECRCGOPRFVPEG.....ARHCDAADPVARR

ASIC 340 YKECAIPALDFLVEKD..OEYCCCEMPCHLTRYGKELSMVKIP
MDEG 339 HKECAEPALGLLAEKD..SNVCCCRTPCNLTRYNKELSMVKIP
FaNaCh 385 YLACEEREOKNLNNDRTYELSCGCFOPCSETSYLKSSTSYWPLEFYQLSAVERFFKOER
MEC-4 622 CLMARMDLGG LHG...SFRRCRCOOPCGOSIYSVTYS PAKWPSLSLQIOLG...

ASIC 381 .....SKASAKYLAKKFNKSE O.....YIGENI
MDEG 380 .....SKTSAKYLEKKFNKSEK.....YISENI
FaNaCh 445 OAGONHFMKTAYEYLEKLAHPSRKHLARNDSHMDLILSKSYSLSSEKEMAKEASDLIRNM
MEC-4 670 .....SCNGTAVECNKHYKENG

                                M II

ASIC 404 LVLDIFFEV LNYETIEOKKAYEAGLLGDIGGOMGLFIGASLTLELFDYAYEVIKHL
MDEG 403 LVLDIFFEALNYETIEOKKAYEAGLLGDIGGOMGLFIGASLTLELFDYAYELIKEHL
FaNaCh 505 LRLLEIYLEDL SVVEYROLPAYGEADLFIDIGGTIGLWIGISLTLELIELLIRLTGLVF
MEC-4 687 A.....FMEOLNPEEMNTISEAYGFVNLLDFGGGLWCGISFLTCCFEVFLFLETAYMSA

ASIC 464 CRRGKCKEAKRSSADKGVALSLDDVKRHNPCSSLRGHPAGDLYAVLLPHHPARGTFEDEFEC
MDEG 463 ...LDL LGKEEEEGSHDENIS...TCDAIPPHSETSHIVNVPLOTALGTLEECAC
FaNaCh 565 NSEKGLPAGPTTVNNNGSNHNSOSTSOHOLYNGYMDHDSHYSDAAGASVFDFFRRGVESPV
MEC-4 747 EHNYSLYKKKKKA EKA KKVASGSF.....

```

Fig. 2 (suite)

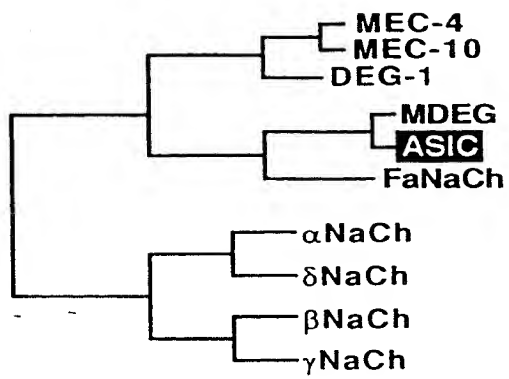


Fig. 3

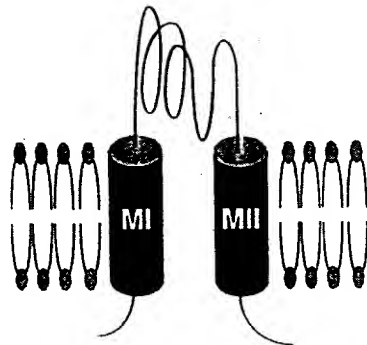


Fig. 4

Fig. 5

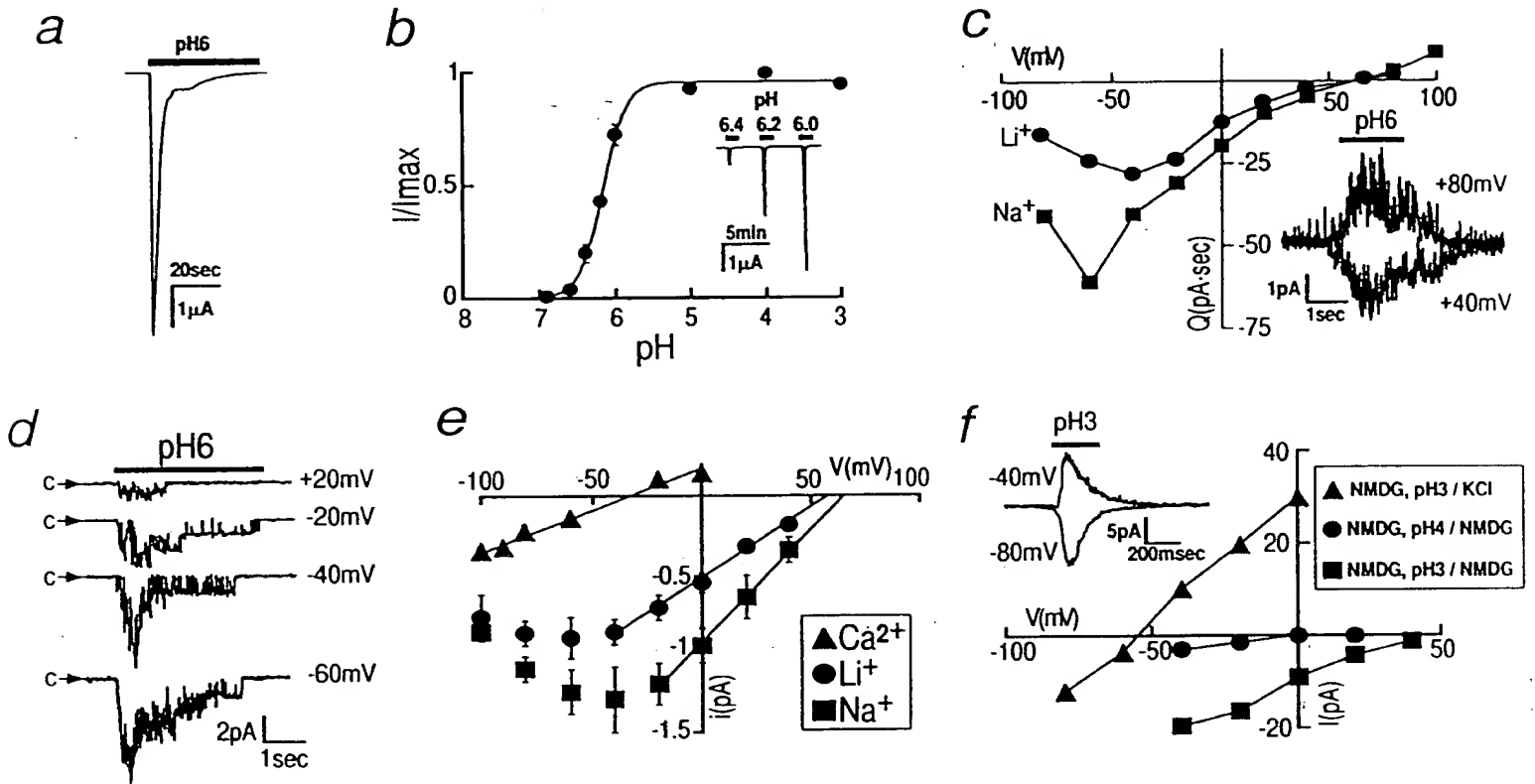


Fig. 6

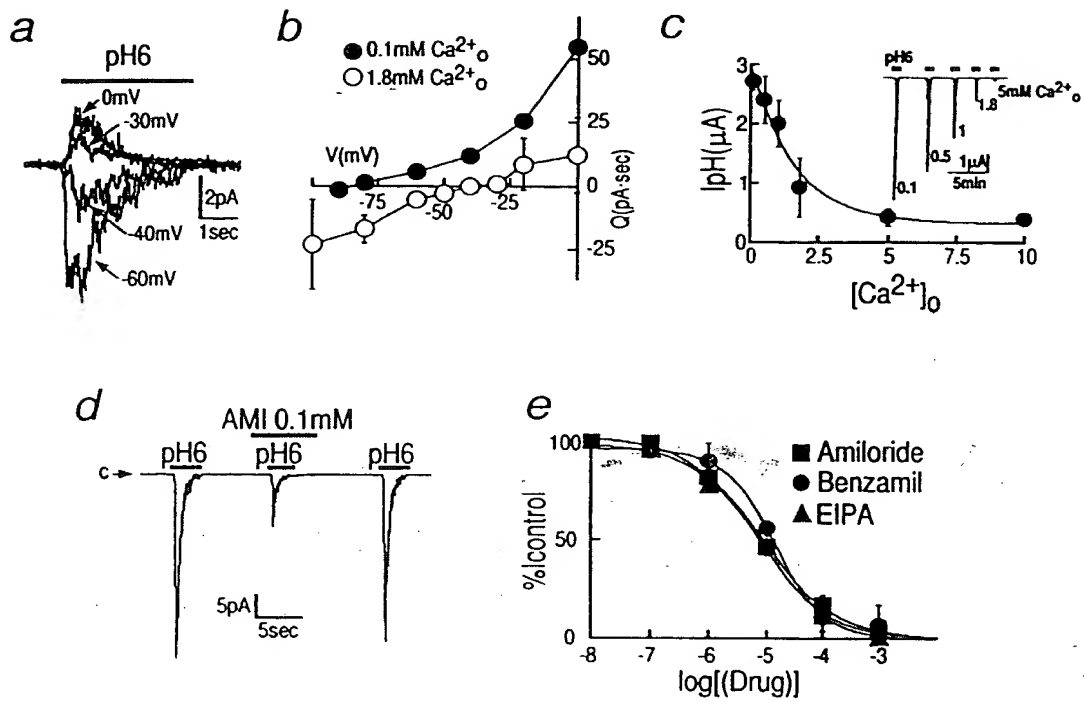


Fig. 7

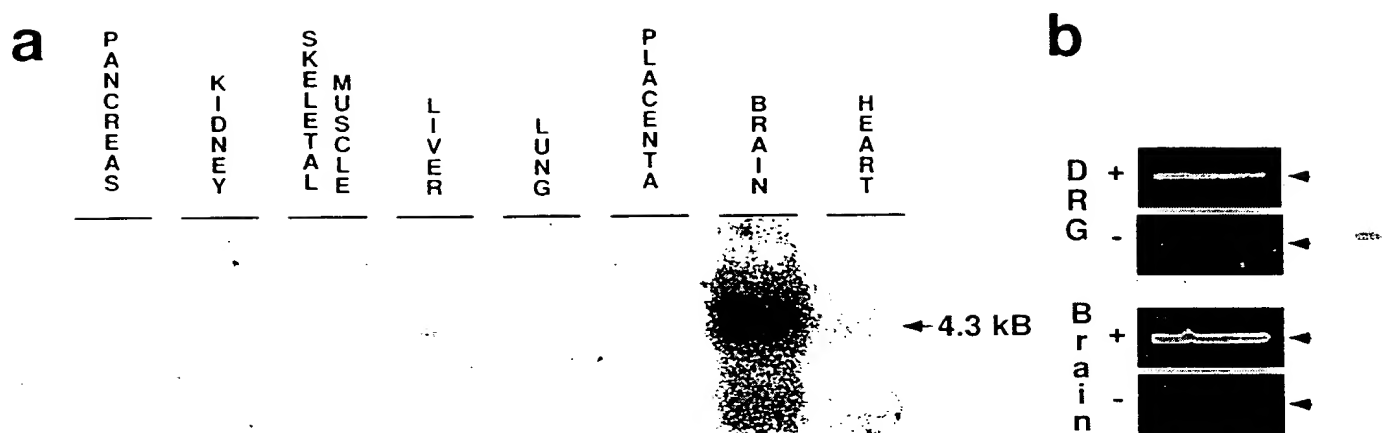
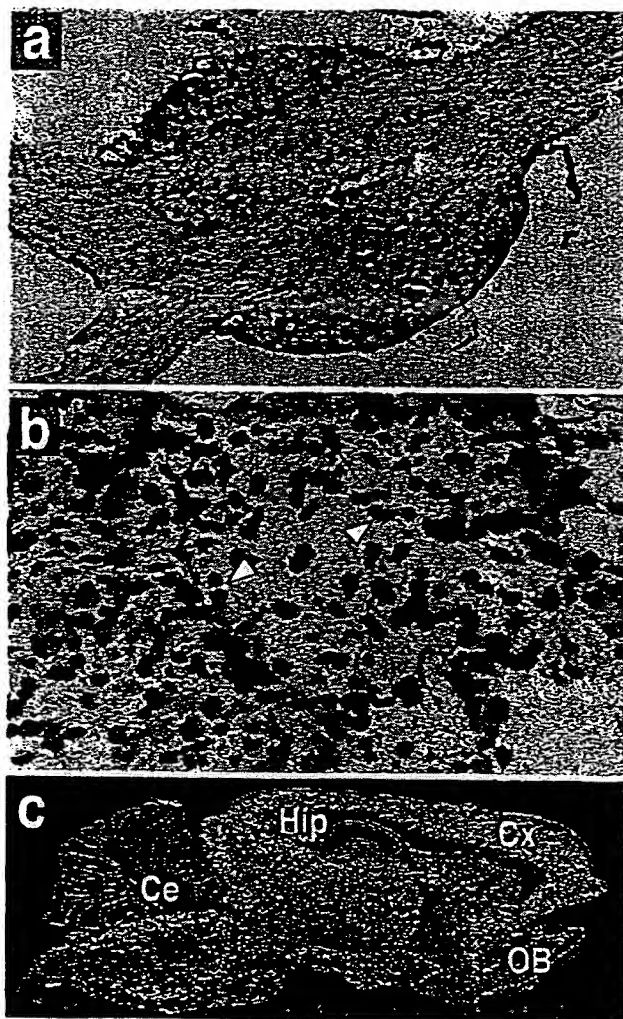


Fig. 8





RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
WALDMANN R ET AL : " THE MAMMALIAN DEGENERIN MDEG, AN AMILORIDE-SENSITIVE CATION CHANNEL ACTIVE BY MUTATIONS CAUSING NEURODEGENERATION IN CAENORHABDITIS ELEGANS " JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, n° 18, 3 mai 1996, pages 10433-10436, XP002051361 - le document en entier	1,7,8,14-18
GILBERTSON, TIMOTHY A. ET AL : " Proton currents through amiloride-Sensitive sodium channels in isolated hamster taste cells : Enhancement by vasopressin and cAMP " NEURON (1993), 10(5), 931-42 CODEN : NERNET ; ISSN : 0896-6273, XPOO2O68540 - page 938 - page 939	1,7,8,14-18
PRICE MP ET AL : " Cloning and expression of a novel human brain Na ⁺ Channel. " J BIOL CHEM, APR 5 1996, 271 (14) p7879-82, UNITED STATES, XP002068541 - le document en entier	1,7,8,14-16,18
EMBL databank Accession number w62694 09-JUN-1996 Marra M et al. - le document en entier	1,7,8,14-16,18

**2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT
L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

AKAIKE N ET AL : " Proton-induced current in neuronal cells. " PROG NEUROBIOL,
MAY 1994, 43 (1) P73-83, ENGLAND, XP002068567

WALDMANN R ET AL : " A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. "
NATURE, MAR 13 1997, 386 (6621) P173-7, ENGLAND, XP002068589
" document ne faisant pas partie de l'état de la technique "

BASSILANA F ET AL : " The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the
Mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel
Properties. " J BIOL CHEM, NOV 14 1997, 272 (46) P28819-22, UNITED STATES,
XP002068543
" document ne faisant pas partie de l'état de la technique "

LINGUEGLIA E ET AL : " A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain
And dorsal root ganglion cells. " J BIOL CHEM, NOV 21 1997, 272 (47) P29778-83, XP002068544
" document ne faisant pas partie de l'état de la technique "

BARRY P ET AL : " Molecular biology of Na⁺ absorption. " AM J PHYSIOL, SEP 1997, 273 (3 PT 1)
PG571-85, UNITED STATES, XP002068545" document ne faisant pas partie de l'état de la technique "

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE
DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

THIS PAGE BLANK (USPTO)